様式 C-19

科学研究費補助金研究成果報告書

平成２３年５月２０日現在

機関番号：１３５０１
研究種目：基盤研究（C）
研究期間：2008～2010
課題番号：20591910
研究課題名（和文）体細胞核移植技術を応用した性ステロイドホルモン受容体遺伝子発現機構の解析

研究課題名（英文）Analysis of regulatory mechanism of gene expression of sex steroid hormone receptors using somatic cell nuclear transfer technique
研究代表者　平田　修司（HIRATA SHUJI）
山梨大学・大学院医学工学総合研究部・教授
研究者番号：00228785

研究成果の概要（和文）：本研究は体細胞核移植技術を用いて性ステロイドホルモン（とくにERα）の遺伝子発現機構を解析することを目的としたものであるが、初年度ならびに第二年度の研究の遂行の結果、現段階での体細胞核移植の技術水準では、その技術の本研究への応用は困難であることが明らかになった。そこで、本年度は、体細胞核移植の技術水準を本研究への応用が可能なレベルまでに改良することを最優先課題とした。その際、体細胞核移植技術の将来的な再生医療への応用をも展望して卵子を凍結保存し、必要時に解凍して使用するシステムの開発を試みた。マウスを被検動物として、除核未受精卵を凍結・保存した後、解凍後に体細胞核移植に供した。核のドナー細胞をして、卵丘細胞を用いた。その結果、凍結除核未受精卵を用いた再構築胚は発生を開始し、生仔を得ることができた。この成績から、体細胞核移植技術の再生医療への応用に、凍結除核未受精卵の保存システムが応用できることが初めて明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：The aim of this study is to investigate the regulatory mechanism of gene expression of sex steroid hormone receptors, especially estrogen receptor alpha, using the somatic cell nuclear transfer (SCNT) technique. However, the studies in the first and second years of this project revealed that the SCNT technique is difficult to be applied on the study because of immaturity of the technique. Thus, I focused on the improvement of the technique in this project. As the result, I have revealed that the frozen-thawed ooplasm can be used for the SCNT for the first time.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合　計
2008 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2009 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
総　計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学
科研費の分科・細目：外科系臨床医学・産婦人科学
キーワード：体細胞核移植、除核卵子、凍結、クローンマウス

１．研究開始当初の背景

申請者は 1990 年より性ステロイドホルモン受容体（SHR）の遺伝子発現調節についての研究を開始し、まず、ヒトおよびラットの子宮内膜ならびに脳におけるエストロゲン受容体（estrogen receptor alpha、estrogen

receptor beta；以下、ER・、ER・）ならびにプロゲステロン受容体（progesterone receptor；以下、PR）の発現の組織特異性ならびに発達段階特異性が、主に転写段階で調節されることを明らかにした。つづいて、これらの SHR の遺伝子発現の調節機構を解明する目的で、1995 年より ER ならびに PR のプロモーターの解析に着手し、ヒトおよびラットの ER・ および ER・・遺伝子には、「多重プロモーターならびに多重非翻訳第一エキソン機構」が存在し、この機構によって極めて精緻に遺伝子発現が調節されることを明らかにしてきた。さらに、この研究の過程で、従来はイントロンと考えられてきた部位に新規のプロモーターならびに非翻訳エキソンが存在し、SHR 分子のホルモン結合領域は有するが DNA 結合領域を欠いた SHR isoform をコードする mRNA が生理的に存在することをヒトの ER・、ER・・および・ PR 遺伝子においてはじめて明らかにした。しかしながら、研究開始段階ならびに現段階において、ER・、ER・・および・ PR 遺伝子の多重プロモーターによる組織特異的ならびに発達段階特異的な遺伝子発現の調節、ならびに、癌化に伴う遺伝子発現の変化のメカニズムについては解明にはいたっていない。SHR 遺伝子の多重プロモーターによる遺伝子発現機構の解明が、SH の様々な生理作用や SH 依存性疾患の病態生理の解明にとって極めて重要であるにもかかわらず、その研究が遅れている大きな理由は、プロモーター活性の調節機構についての現在の研究手技上の制約である。そこで、本研究は、体細胞核移植（somatic cell-nuclear transfer；SCNT）技術を用いて、SHR 遺伝子の多重プロモーター機構による組織特異的ならびに発達段階特異的な遺伝子発現の調節機構を解明しようと考えた。

２．研究の目的

SHR 遺伝子の多重プロモーターによる遺伝子発現機構の解明が、SH の様々な生理作用や SH 依存性疾患の病態生理の解明にとって極めて重要であるにもかかわらず、その研究が遅れている大きな理由は、プロモーター活性の調節機構についての現在の研究手技上の制約である。すなわち、プロモーター活性についての研究は、（１）当該プロモーター領域をクローニングして、その種々の部分をレポーターに接続して *in vitro* で発現させ、遺伝子転写の調節領域を同定する、（２）この転写調節領域に結合する転写因子ならびに転写調節因子を同定する、（３）当該プロモーター領域のメチル化ならびに同部位に存在するヒストンのアセチル化を解析する、（４）これらのデータと *in vivo* での転写活性を比較検討することによって行われるのが一般的である。しかし、SHR の遺伝子発現は、複数のプロモーターの一つ一つの活性が種々の条件下でそれぞれ異なる変化を生じ、その総和として SHR mRNA の発現レベルが決定するので、単一のプロモーター活性の研究では、SHR 遺伝子の発現調節機構の解明が困難である。とくに、単一のプロモーターを用いた *in vitro* での活性解析では、複数のプロモーターの相互作用についての検討は不可能といわざるを得ない。申請者は、以上のような、プロモーター活性についての研究の手技上の制約を打破する目的で、体細胞核移植（somatic cell-nuclear transfer；SCNT）技術を応用することを考えた。周知のごとく、SCNT は体細胞の核を除核未受精卵に顕微注入するものであるが、得られた再構築胚を活性化して発生させることによって、「体細胞クローン」個体が作出されている。このことは、未受精卵の細胞質内に、体細胞核の遺伝情報をリセットしそれを再び初期発生せしめることが可能な「リプログラミング因子（reprogramming factor；以下、RF）」が存在することを実証している。申請者は、この RF に着目し、これを用いて SHR 遺伝子の多重プロモーター機構による組織特異的ならびに発達段階特異的な遺伝子発現の調節機構を解明することを企図した。すなわち、培養細胞ならびに生体から得られる細胞においては、その細胞ならびに組織特異的に SHR 遺伝子の多重プロモーターのうち、一部はメチル化等によって不活性化され、また、一部はヒストンのアセチル化等によって活性化されている。したがって、SHR 遺伝子の多重プロモーター機構による組織特異的ならびに発達段階特異的な遺伝子発現の調節は、発生初期ならびに発生過程におけるプロモーターの修飾によって基本的に規定されている。つまり、SHR 遺伝子の遺伝子発現の調節機構の解明には、このような発生過程におけるプロモーターの修飾についての研究がまず必要であり、しかる後に、このようにして発生過程で修飾されたプロモーターの活性調節機構を研究すべきであると考え、本研究の目的に設定した。

３．研究の方法

SCNT の技術水準を本研究への応用が可能なレベルまでに改良することを最優先課題としたが、そのためには、SCNT の技術水準が将来的な再生医療への応用が可能なレベルに達する必要があると考えられた。具体的には、SCNT の将来的な臨床応用に際しては、除核卵

子が多数必要となるが、現実には必要時に必要な数の卵子を準備することはほとんど不可能であることが大きな障害となる。そこで、卵子を凍結保存し、必要時に回答して使用するシステムの開発を試みた。なお、卵子提供者の心理的障壁を取り除くために、他の用途に流用させることのないように、採卵した卵子から予め核（紡錘体）を除去して凍結することとした。マウスを被検動物として、除核未受精卵を凍結・保存した後、解凍後に体細胞核移植に供した。核のドナー細胞をして、卵丘細胞を用いた。作出した再構築胚の初期発生を解析するとともに、偽妊娠マウスに胚移植して、生仔の獲得率を解析した。

４．研究成果

マウスを被検動物として、非凍結コントロール卵子を用いて SCNT を行った場合、胚盤胞到達率は概ね　50％ 程度であり、それを胚移植して得られる生仔の獲得率は 2 ％ 程度である。この成績は、現段階の水準での SCNT によって得られる再構築胚の「品質」が胚ごとに大きく異なることを意味する。今回の性ステロイドホルモン受容体の遺伝子発現の解析の目的では、当初、この再構築胚から得られた ES 細胞（クローン-ES 細胞）を研究に供する予定であったが、当初の 2 年間の研究の遂行によっても、この不均一性を改善することは困難であった。こうした不均一な細胞を用いて本研究を遂行しても、得られる結果の確度に極めて大きな問題が生じる。そのために、SCNT の技術水準を本研究への応用が可能なレベルまでに、具体的には、将来的な再生医療への応用が可能なレベルに改善することを最優先課題とした。

具体的には、マウスを被検動物として、除核未受精卵を凍結・保存した後、解凍後に体細胞核移植に供したところ、胚盤胞到達率は概ね　15% 程度であり、それを胚移植して得られる生仔の獲得率は 0.2 ％ 程度であった。このように非凍結卵に比して低率ではあるものの、凍結除核未受精卵を用いた再構築胚は発生を開始し、生仔を得ることができたことは、(1) 卵細胞質内の「初期化因子」は凍結によっても活性が失われないこと、また、(2) 体細胞核移植技術の再生医療への応用に、凍結除核未受精卵の保存システムが応用できることを明らかにしたものである。

なお、SCNT を用いる再生医療の遂行のためには「クローン胚」の作出が必須である。こうしたクローンに関する研究については社会的にも十分にかつ正確に理解されないと、思わぬ誤解を招く可能性がある。この点、本研究費による上記の研究成果は、多くのマスメディアを通じて社会に発信され（共同通信、毎日(全国)、東京、山梨日日(山梨版 一面トップ)、読売山梨版平成 22 年 10 月 19 日、読売山梨版 平成 21 年 4：月 16 日、同平成 21 年 5 月 22 日、同平成 22 年 10 月 20 日、山梨放送 TV 平成 20 年 12 月 6 日、平成 22 年 10 月 19 日、テレビ山梨 平成 20 年 7 月 4 日、平成 22 年 10 月 19 日)、「体細胞クローン胚の臨床応用」についての分かりやすい情報を少なからず提供できた。

繰り返し述べてきたように、本研究の当初の研究課題であった SCNT による SHR の遺伝子発現の解析については、3 年間の研究によって、ようやく SCNT の技術レベルが研究に応用可能なところにたどり着いた段階であり、今後、さらに研究を継続する。しかしながら、本研究費による研究成果は、当初想定していたものとは異なるものの、今後の SCNT を用いた再生医療や細胞生物学的研究に極めて有意義であるばかりでなく、社会的にも十分に意義のあるものにできたものと自負するものである。

５．主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕（計 8 件）

1) Shuji H, Hiroko F, Sayaka W, Teruhiko W, Kazuhiko H：Generation of Healthy Cloned Mice Using Enucleated Cryopresereved Oocytes. CELLULAR REPROGRAMMING　査読有 13(1):7-11, 2011

2) 渡邊直子, 川島由加里, 平田希, 菊嶋聡子, 平田修司：頸管縫縮術の適応と有効性. 山梨産科婦人科学会雑誌　査読有 1(2):16-22, 2011

3) 平田修司, 奥田靖彦, 小室真祐子：院内助産システムの今後-第 51 回日本母性衛生学会学術集会シンポジウム[3]より-当院で行っている助産師教育ならびに資格認定と今後の展望. 日本母性衛生学会雑誌　査読有 52(1):44-49, 2010

4) Rei S, Shuji H：The role of pregnancy associated progenitor cells in the regeneration of injured maternal organs. Nihon Rinsho Meneki Gakkai Kaishi 査読有 33(6):287-292, 2010

5) Rei S, Mayuko K, Hikaru T, Shuji H：Migration of microchimeric fetal cells into maternal circulation before placenta formation. Chimerism　査読有 1(2):1-3, 2010

6) Hikaru T, Hiroko F, Tomoko S, Kazuhiko H, Shuji H：Novel alpha-fetoprotein-V

messenger RNA isoforms in humans. Reproductive Sciences　査読有 16(8):794-801,2009

7)鈴木真梨子,正田朋子,平田修司,星和彦:マウス精巣への in vivo 遺伝子導入による外来遺伝子の発現の検討　山梨医科学雑誌　査読有 24(3):75-81,2009

8)Rei S,Mayuko K,Tsutomu Y, Kazuhiko H,Shuji H:Fetal cell microchimerism develops through the migration of fetus-derived cells to the maternal organs early after implantation. Journal of Reproductive Immunology. 査読有 84:117-123,2009

〔学会発表〕(計 11 件)
1)平田修司:不妊治療の現状と将来の展望,長野県厚生農業協同組合連合会富士見高原病院 講演会,長野,2011.2.17

2)平田修司:不妊治療の現状と将来の展望,仙台医会講演,仙台,2011.2.2

3)平田修司:不妊治療の現状と将来の展望,第 7 回山形県生殖生理研究会,山形,2011.1.28

4)深澤宏子,藤江道子,平田修司:MESI 法を用いた 1-day-old 卵の紡錘体ならびに細胞質の機能の検討, 第 55 回日本生殖医学会総会・学術講演会,徳島,2010.11.11

5)和田麻美子,笠井剛,大木麻喜,朝田嘉一,平田修司:卵巣刺激選択の基準となる AMH 値についての検討, 第 55 回日本生殖医学会総会・学術講演会,徳島, 2010.11.11

6)藤江道子,深澤宏子,下地彩乃,正田朋子,平田修司:紡錘体の卵細胞質内へのマイクロインジェクションによる卵細胞質置換法についての検討, 第 55 回日本生殖医学会総会・学術講演会,徳島,2010.11.11

7)平田修司:不妊治療の現状と今後の展望(特別講演), 平成 22 年度日産婦会福島地方部会秋季学術集会,福島,2010.10.24

8)平田修司:不妊治療の現状と今後の展望,第 55 回日本生殖医学会総会・学術講演会, 第 124 回長野県産科婦人科医会・学術講演会,松本,2010.10.16

9)平田修司:体細胞クローン技術の医学への応用を見据えて. 2010 年度山梨大学医学部同窓会総会,甲府,2010.7.10

10)平田修司,深澤宏子,下地彩乃,正田朋子,星和彦:毛根細胞を核のドナーとして体細胞クローンマウスの作出, 第 62 回日本産科婦人科学術講演会,東京,2010.4.23

11)平田修司:不妊治療の現状と今後の展望,第 72 回日本泌尿器科学会山梨地方部会(サテライトシンポジウム),甲府,2010.3.20

６．研究組織
(1)研究代表者
平田　修司 (HIRATA SHUJI)
山梨大学・大学院医学工学総合研究部・教授
研究者番号:00228785
(2)研究分担者
深澤　宏子 (FUKASAWA HIROKO)
山梨大学・大学院医学工学総合研究部・助教
研究者番号:60362608
(3)研究分担者
正田　朋子 (SHODA TOMOKO)
山梨大学・大学院医学工学総合研究部・助教
研究者番号:50345716
(4)研究分担者
多賀谷　光 (TAGAYA HIKARU)
山梨大学・大学院医学工学総合研究部・特任助教
研究者番号:50418711
(5)研究分担者
星　和彦 (HOSHI KAZUHIKO)
山梨大学・大学院医学工学総合研究部・理事
研究者番号:20111289